

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Produção *in vitro* de embriões Bovinos**

**Relatório De Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório**

**ANA CAROLINA DE BRITO SILVA E SIQUEIRA**

ARAGUAÍNA / TO  
2014

# **PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**ANA CAROLINA DE BRITO SILVA E SIQUEIRA**

Relatório de estágio curricular apresentado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia como requisito para obtenção do título de graduado em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes.

Supervisor: Dr. Rodrigo Mendes Untura

Siqueira, Ana Carolina de Brito Silva e

PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

32f.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes

Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal do Tocantins,  
2014.

## **PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**ANA CAROLINA DE BRITO SILVA E SIQUEIRA**

Relatório apresentado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia como requisito para obtenção do título de graduado em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes.

Supervisor: Dr. Rodrigo Mendes Untura

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes (Orientador)

---

Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

---

Prof. Dr. Michel José Sales Abdalla Helayel

À minha mãe Rosa Brito, pelo esforço e dedicação empenhados para a realização dessa conquista.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o grande criador, que me confiou a vida e sempre direcionou meus caminhos.

A minha avó Carmelita Guimarães de Brito, que plantou em mim o desejo de lidar com os animais.

A minha mãe Rosa Brito, por me apoiar e não medir esforços para tornar essa jornada o mais fácil possível. Por compreender minha ausência nos finais de semana passados na faculdade. Por ser exemplo de responsabilidade e perseverança. Pelos ensinamentos e suporte sem os quais não seria possível alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares que acreditaram na minha capacidade de vencer mais esta batalha. Em especial ao meu avô Antônio, as minhas tias Onésia, Meirinha, Rosângela e Rosália e aos meus tios Sebastião e Eurico. Obrigada a essa família que além de apoio me transmite paz e carinho.

Aos amigos que estiveram ao meu lado nessa jornada me fazendo sorrir nos momentos alegres e me dando segurança e apoio quando necessário.

Aos meus professores orientadores, com os quais pude ir além do aprendizado em sala de aula, ampliando meus conhecimentos práticos, em especial ao Prof. Dr. Gilberto de Lima Macedo Junior, com quem iniciei o aprendizado na pesquisa científica.

Aos técnicos que me deram a oportunidade de vivenciar a “vida de um Zootecnista” a campo.

Ao Prof. Márcio Gianordoli que se disponibilizou a me orientar na realização deste trabalho. Por sua compreensão e empenho.

Ao corpo docente da Universidade Federal do Tocantins pela contribuição na minha formação profissional.

A empresa *In Vitro Brasil*, em especial a equipe que contribuiu de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

*“Mantenha as suas atitudes positivas, pois suas atitudes tornam-se hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores tornam-se seu destino”.*

**Mahatma Gandhi**

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1-</b> Punção de líquido folicular em ovário oriundo de vaca no abatedouro. ....	17
<b>Figura 2 –</b> Depósito de líquido folicular em tubo de 50ml para posterior filtração.....	17
<b>Figura 3 -</b> Filtração de líquido folicular em filtro coletor de oócitos.....	18
<b>Figura 4 -</b> Oócitos imaturos com <i>cumulus</i> compacto.....	18
<b>Figura 5 -</b> Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 90 µL de meio de maturação cobertas por 4ml de óleo mineral, para depósito de oócitos a serem maturados.....	19
<b>Figura 6 -</b> Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 90 µL de meio FIV gotas cobertas por 4 ml óleo mineral, para fertilização dos oócitos. ....	20
<b>Figura 7 –</b> Visualização de embriões em lupa 24 horas após a fecundação. ....	21
<b>Figura 8 -</b> Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 100 µL de meio de CIV coberta po 4 ml de óleo mineral. ....	21
<b>Figura 9 –</b> Visualização de oócitos em lupa após 23 horas na placa de cultivo.....	21
<b>Figura 10 –</b> Visualização de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> .....	23



## **LISTA DE TABELA**

<b>TABELA 01</b> - Classificação dos embriões bovinos quanto ao estágio de desenvolvimento e idade aproximada.....	22
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURA**

- Be - Blastocisto eclodido
- Bi - Blastocisto inicial
- Bl - Blastocisto
- Bx - Blastocisto expandido
- CIV - Cultivo in vitro de embriões
- FIV - Fertilização in vitro de embriões
- MIV - Maturação in vitro de embriões
- PIV - Produção in vitro de embriões
- GnRH- Gonadrotofina
- FSH -Hormônio Foliculo Estimulante
- LH -Hormônio Luteinizante

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	144
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE ESTÁGIO .....	15
2.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	15
2.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR OU <i>OVUM PICK UP</i> (OPU) .....	15
2.4 PUNÇÃO DE OÓCITOS DE OVÁRIOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS .....	16
2.5 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV) .....	188
2.6 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	199
2.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV) .....	211
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	24
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	255

## RESUMO

SIQUEIRA, A. C. B. S. Relatório de estágio curricular supervisionado: Produção *in vitro* de embriões bovinos, 2014. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Zootecnia).

O estágio curricular supervisionado obrigatório ocorreu no período de 23 de Outubro a 20 de Dezembro de 2013 na filial da empresa In Vitro Brasil, localizada em Xinguara – PA, totalizando 344 horas, e foi realizado no laboratório de produção de embriões, sob supervisão do médico veterinário Rodrigo Mendes Untura. A área de concentração do estágio foi a Produção e Reprodução Animal, com foco na produção *in vitro* de embriões bovinos. Durante o estágio foi acompanhado as etapas do processo de produção de embriões, a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), assim como a aspiração folicular (OPU) e transferência de embriões (TE). O laboratório é composto por uma recepção, escritório, sala para aspiração, sala de esterilização, sala de produção de embriões e sala de estoque. A produção *in vitro* de embriões (PIV), é uma importante ferramenta para acelerar o ganho genético do rebanho bovino. O objetivo do estágio curricular supervisionado obrigatório foi aprofundar os conhecimentos adquiridos na universidade com o dia a dia do estágio.

**Palavras chaves** : bovinos, *in vitro* ,reprodução, transferência de embriões.

## **ABSTRACT**

The curriculum supervised mandatory occurred from October 23 to December 20, 2013 in branch office In Vitro Brazil , located in Xinguara - PA to 344 hours and was performed in embryo production laboratory under physician supervision Rodrigo Mendes Untura veterinarian . The area of concentration stage was the Animal Production and Reproduction , focusing on the in vitro production of bovine embryos . During the stage was accompanied stages of embryo production process , in vitro maturation ( IVM) , in vitro fertilization ( IVF ) and in vitro culture ( IVC ) , as well as follicular aspiration ( OPU ) and embryo transfer (ET .) The laboratory consists of a reception room, study, suction , sterilization room, embryo production room and stock room . The in vitro embryo production (IVP ) is an important tool to accelerate genetic gain of cattle . The objective of the course was mandatory supervised deepen the knowledge acquired at the university with the day to day stage .

**Keywords:** cattle, in vitro production of embryos, embryo transfer

## 1 INTRODUÇÃO

A intensificação da pecuária torna-se cada vez mais necessária para manter os produtores no mercado de forma competitiva e rentável. Impulsionando a adoção de biotecnologias reprodutivas para atender uma demanda cada vez mais crescente.

A produção *in vitro* de embriões é uma importante alternativa para o aumento da produção pecuária, permite redução no intervalo de gerações e intensifica a pressão de seleção genética. Além de servir para o desenvolvimento de outras biotecnologias reprodutivas como clonagem e sexagem.

A produção de embriões *in vitro* possui extrema importância para aumentar a velocidade de ganho genético do rebanho nacional (RENESTO e COELHO, 2004), possibilita uma maior disseminação da genética das fêmeas, permitindo um melhor aproveitamento de fêmeas com potencial zootécnico superior, e as vacas doadoras de oócitos são parte fundamental nesse processo. Além de diminuir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações do aparelho reprodutor que as impeçam de se reproduzir naturalmente ou fêmeas que ainda não estão aptas a gestações, e otimizar a utilização do sêmen, possibilitando o uso de apenas uma dose para fecundar oócitos de várias vacas.

A alta produção de embriões via FIV requer grande quantidade de oócitos, e a utilização de ovários de vacas de abatedouro para aquisição dos oócitos é uma alternativa para maximizar o uso da técnica. Com o aproveitamento do material genético de vacas destinadas ao abate o rebanho comercial é multiplicado.

O primeiro bezerro nascido de FIV, a partir de um ovócito, cuja maturação foi realizada *in vitro*, ocorreu em 1981 (BRACKETT et al., 1982). Os primeiros produtos de PIVe no Brasil foram obtidos em 1994. Desde essa época buscou-se melhorias para expansão da técnica. A produção *in vitro* de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporada aos meios de produção, juntamente com a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia *Ovum pick up* (OPU), favorecendo os programas de melhoramento genético (ALVES et al., 2001).

Atualmente o país se encontra em uma situação privilegiada, sendo líder mundial e referência na PIV de embriões bovinos. A crescente busca por essa tecnologia, tornou possível sua aplicação em escala comercial no mundo.

Mesmo com os avanços alcançados, a técnica ainda é pouco difundida, ainda aparecerem variações nos custos e nos resultados (FERNANDES, 2001). Parte das variações na PIVe estão ligadas ao volume de produção. As variáveis que interferem nos resultados vão desde o manejo das vacas até fatores laboratoriais. A infraestrutura das propriedades pode ser um fator limitante para adesão da técnica.

A opção pelo estágio em produção e reprodução animal foi mediante o interesse em atuar na área e aprofundar os conhecimentos adquiridos na universidade com o dia a dia do estágio.

O objetivo desse relatório consiste em descrever as atividades desenvolvidas e acompanhadas durante o Estágio Supervisionado na filial da empresa In Vitro Brasil de Xinguara-PA.

O grupo *In Vitro Brasil* é uma empresa, totalmente brasileira que está presente em 11 países (África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Colômbia, Estados Unidos, Panamá, Paraguai, Rússia, Uruguai e Venezuela), com mais de 30 laboratórios próprios e afiliados, e é hoje a maior empresa de produção de embriões FIV do mundo. A tecnologia desenvolvida pela empresa representa 45% da produção mundial de embriões. A sede da empresa está localizada em Mogi Mirim – SP.

A área de concentração do estágio foi a Produção e Reprodução Animal, com foco na produção *in vitro* de embriões bovinos. No decorrer do estágio foram atendidas propriedades na região norte do país, nos estados do Pará, Tocantins e Maranhão.

## **2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

Foram acompanhadas todas as etapas do processo de produção *in vitro* de embriões (PIVe), assim como de transferência dos embriões a campo, compreendendo as seguintes etapas: coleta de oócitos por meio da aspiração folicular *in vivo* ou punção de oócitos em laboratório em ovários provenientes de vacas em abatedouro; seleção de oócitos; maturação *in vitro* de oócitos (MIV); fertilização *in vitro* de oócitos (FIV); cultivo *in vitro* de embriões (CIV); envase de embriões e transferência de embriões em vacas receptoras sincronizadas.

A equipe de trabalho era composta por nove técnicos que realizavam etapas distintas do processo. Contendo aspirador, sincronizador, produtor de embriões e transferidor. Os processos de sincronização de receptoras, aspiração folicular e transferência de embriões de competência de médicos veterinários, e a produção in vitro de embriões a cargo de zootecnistas, médicos veterinários e biomédicos.

## 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado foi realizado na filial da empresa In Vitro Brasil, localizada em Xinguara – PA, no período de 23 de Outubro a 20 de Dezembro de 2013, totalizando 344hs. Orientado pelo Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes e supervisionado pelo Dr. Rodrigo Mendes Untura.

## 2.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A filial da empresa *In Vitro Brasil*, localiza-se na Av. Xingú nº 268, centro de Xinguara-PA, onde encontra-se o laboratório de produção de embriões, composto por uma recepção, escritório, sala para aspiração, sala de produção de embriões e sala de estoque.

## 2.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR OU OVUM PICK UP (OPU)

A aspiração folicular é a retirada de oócitos dos ovários de vacas em ovulação. Para realizar a aspiração folicular nas doadoras, é necessário o auxílio de aparelho de ultrassonografia com sonda acoplada a bomba a vácuo, auxiliando a retirada dos oócitos por meio de agulha hipodérmica descartável.

Os oócitos aspirados na fazenda são encaminhados ao laboratório em criotubos contendo 400 µL de meio de maturação 300 µL de óleo mineral e gás mistura padrão contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> e 90 % de N.



A quantidade de oócitos produzida por animal, variam conforme o grupo racial, estado nutricional da vaca e frequência de aspirações. Em vacas zebuínas o percentual produzido é superior aos animais taurinos.

A média de oócitos recuperados por ovário está entre seis e dez, sendo que a quantidade e a qualidade dos oócitos obtidos é influenciada pela época do ano, estado fisiológico do animal e tamanho do folículo aspirado (DODE & RODOVALHO, 2001).

Deve-se manter um período mínimo de descanso, para que a produção de oócitos das doadoras não seja interferida.

Normalmente as aspirações foram realizadas em vacas da raça Nelore e da raça Gir Leiteira. Com média de aspiração em torno de 25 oócitos por vaca nelore em cada mês.

A qualidade dos oócitos interfere de forma positiva ou negativa na produção in vitro de embriões. A nutrição é um importante fator que afeta o desempenho reprodutivo das fêmeas bovinas, por meio de seu efeito na qualidade dos oócitos e embriões, no número de folículos e corpos lúteos e na concentração circulante de hormônios (SARTORI et al., 2010).

## 2.4 PUNÇÃO DE OÓCITOS DE OVÁRIOS ORIUNDOS DE ABATEDOUROS

Os ovários adquiridos no abatedouro foram transportados até o laboratório em garrafas térmicas contendo solução salina a 0,9% de NaCl em temperatura ambiente.

Ainda acondicionados nas garrafas os ovários foram lavados com solução salina a 36°C. Para posterior realização da punção folicular utilizando-se seringa descartável de 10 ml com agulha descartável de 0,80 x 30 mm. A punção dos oócitos foi realizada no laboratório, possibilitando intervalo mínimo entre o início da obtenção destes ao início da maturação (Figura 1).

A aspiração em vacas de abatedouro permite a utilização da PIVE em escala comercial. Embora a genética da fêmea não seja definida, a uma otimização no aproveitamento da genética de touros.

São aspirados oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Segundo Gonçalves et al. (2002), a classificação dos oócitos pode ser realizada com a escala

de um a quatro, sendo, Qualidade 1: *Cumulus* compacto, presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade 2: *Cumulus* compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida. Qualidade 3: *Cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico, degenerando, vacuolizando ou fragmentando. Qualidade 4: oócito desnudo (sem *cumulus*).

O líquido folicular foi filtrado em filtro coletor de embrião com solução PBS, conforme demonstrado (Figura 2). Posteriormente o líquido foi despejado cuidadosamente em placas de petri de 90 mm para serem selecionados os oócitos, com o auxílio de uma lupa de 10 x A/22, sendo estes classificados em aptos ou não aptos para seguirem no processo de maturação (Figura 3). Sendo desclassificados os oócitos com citoplasma irregular e desnudos (ausência de células do *cumulus*), conforme a quantidade de células do cúmulo e estado do citoplasma. Foram lavados os oócitos em gotas de 70  $\mu\text{L}$  de meio de lavagem colocadas em placa de petri de 90 mm para eliminar o máximo de sujidades e células mortas.

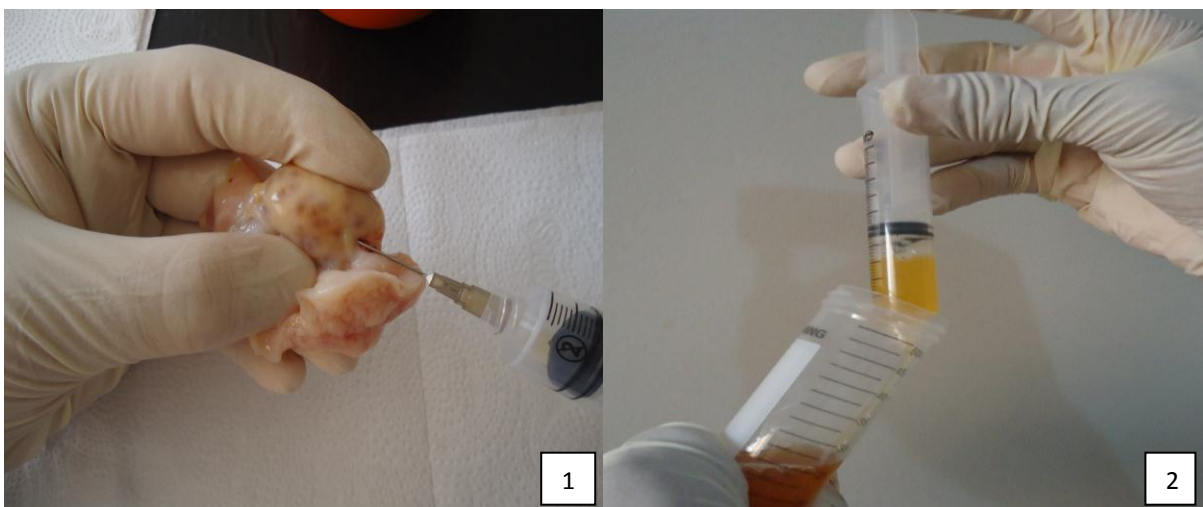


Figura 1- Punção de líquido folicular em ovário oriundo de vaca no abatedouro. Figura 2- Deposito de líquido folicular em tubo de 50 ml para posterior filtração.

Fonte: Arquivo pessoal

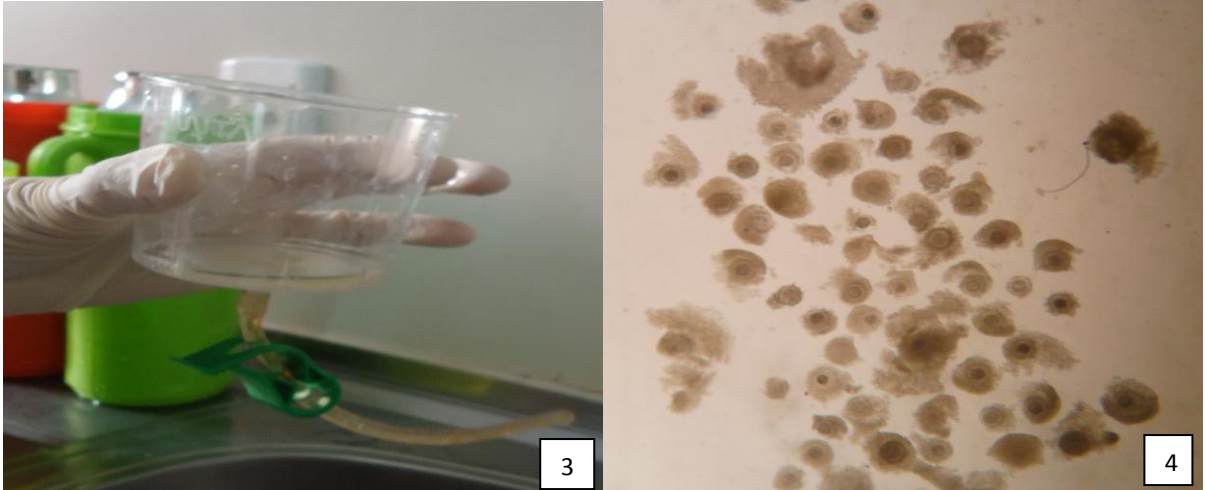


Figura 3- Filtração de líquido folicular em filtro coletor de oócitos. Figura 4- Oócitos imaturos com *cumulus* compacto.

Fonte: Arquivo pessoal

## 2.5 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Os oócitos coletados de ovários no laboratório e aspirados de ovários de vacas a campo foram colocados em meio de maturação (gota de 90  $\mu$ L cobertas por 4 mL de óleo mineral). Conforme Hafez (2004), os meios de maturação contém L-glutamina, bicarbonato de sódio, HEPES, piruvato de sódio e hormônios. Os hormônios que atuam na maturação são LH com função de amadurecimento dos folículos e FSH necessário para o desenvolvimento de um folículo maduro. O meio era aquecido em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 36°C durante uma hora, sendo as gotas com meio de maturação acondicionadas em placas de petri de 35mm (Figura 5), onde permaneceram por um período de 24 horas.

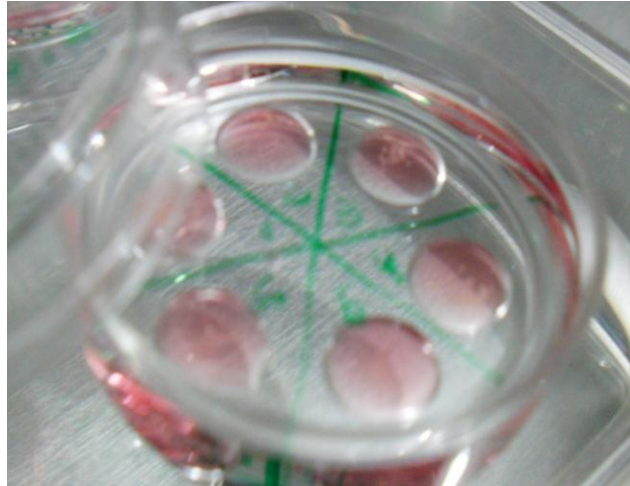


Figura 5 - Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 90  $\mu$ L de meio de maturação cobertas por 4ml de óleo mineral, para depósito de oócitos a serem maturados .

Fonte: Arquivo pessoal

As células do *cúmulos* são extremamente importantes na MIV. Oócitos com ausência de células do *cumulus* podem se tornar embrião, porém com taxas de fertilização reduzidas. Durante a fase de maturação, são secretados hormônios endógenos e fatores promotores produzidos pelo oócito que estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, induzindo a sua expansão (GONÇALVES et al., 2002).

Todos os oócitos maturados in vitro tem a capacidade de serem fertilizados e gerar um embrião viável (GORDON, 2003). Parte do material genético torna-se embrião. As células que tiveram sua divisão interrompida, não permanecem no processo.

A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2005)

## 2.6 FECUNDAÇÃO IN VITRO (FIV)

Os oócitos para serem transferidos para a placa de FIV são lavados em gotas com 70  $\mu$ L de meio TL sêmen<sup>®</sup> e 70  $\mu$ L de FIV em placa de petri de 90mm. As placas de 35mm, continham gotas de meio FIV de 90  $\mu$ L cada para sêmen convencional e 50  $\mu$ L para sêmen sexado com 4 mL de óleo mineral (Figura 6). A

FIV deve ser realizada entre 22 e 24 horas após o início da maturação *in vitro* MIV. No meio de FIV é adicionado heparina e phe, para capacitação espermática.



Figura 6 - Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 90  $\mu$ L de meio FIV gotas cobertas por 4 ml óleo mineral, para fertilização dos oócitos.  
Fonte: Arquivo pessoal

Em caso de sêmen sexado a água foi aquecida a 39°C. O sêmen convencional, descongelado a 36°C por 30 s e colocados em tubo cônico de 15 ml contendo meio determinado conforme o protocolo, para ser centrifugado. Após passar pela centrifuga retira-se o peleti, acondiciona-se em eppendorf de 30  $\mu$ L para fecundar os oócitos.

De acordo com Hafez (2004), a capacitação espermática *in vivo* ocorre, dentre outros fatores, por ação de glicosaminoglicanos presentes no trato genital da fêmea. No processo *in vitro* utiliza-se a heparina, um glicosaminoglicano para a capacitação espermática. Várias proteínas estão envolvidas no processo de capacitação espermática. No processo *in vitro*, o uso da heparina tem demonstrado ser mais eficaz para capacitação espermática (PARRISH et al., 1994). O método mais utilizado para separação do sêmen na centrifuga é o *Percoll*. Entretanto, estudos recentes demonstraram outras técnicas viáveis para separação espermáticas mais eficientes e com uso indicado quando o *Percoll* não alcança bons resultados (LEE et al., 2009).

Após a junção do espermatozoide com o oócito, inicia-se divisões celulares culminando com o processo de fecundação (HAFEZ 2004).

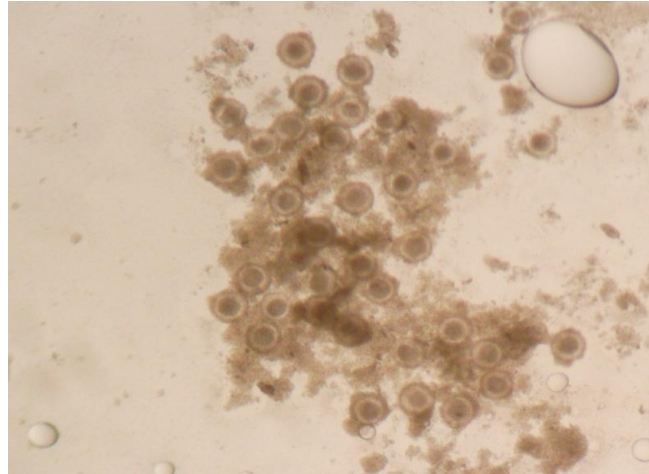


Figura 7 – Visualização de embriões em lupa 24 horas após a fecundação.

Fonte: Arquivo pessoal

## 2.7 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

No cultivo utiliza-se meio SOF. Os oócitos para serem transferidos para a placa de CIV são lavados, com a primeira gota contendo 100  $\mu$ L de meio TL sêmen, a segunda 50  $\mu$ L de TL sêmen mais 50  $\mu$ L de SOF e a terceira gota 100  $\mu$ L de SOF, em placa de petri de 90mm.

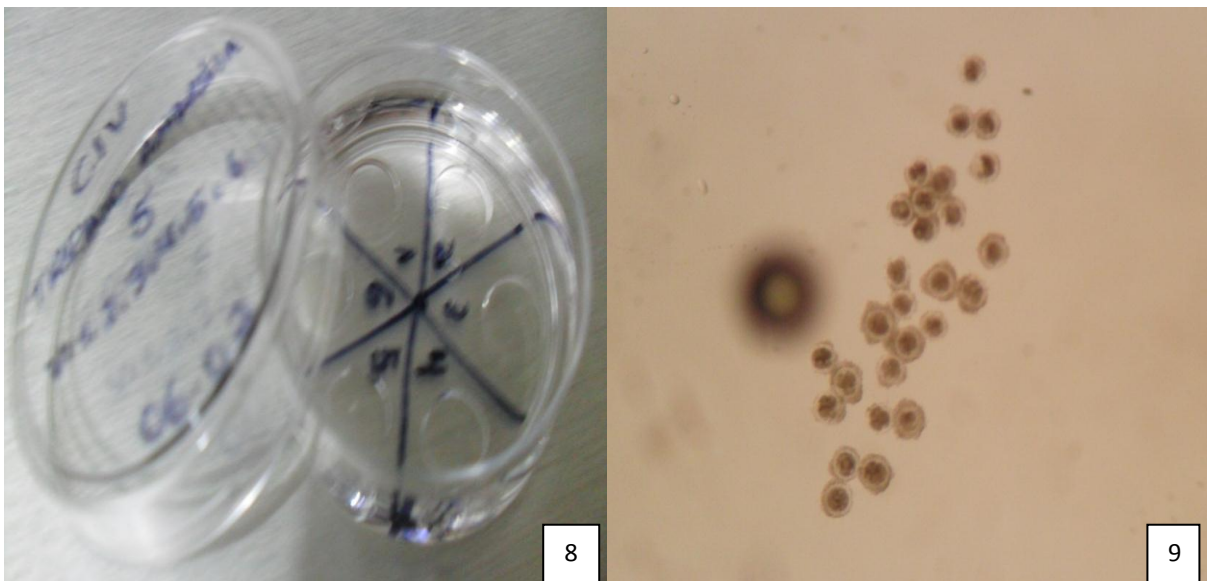


Figura 8 - Placa de petri de 35 ml contendo gotas de 100  $\mu$ L de meio de CIV coberta po 4 ml de óleo mineral. Figura 9 – Visualização de oócitos em lupa após 23 horas na placa de cultivo.

Fonte: Arquivo pessoal



Nessa etapa os oócitos foram desnudados para soltar o excesso de células do cúmulo, pois as células crescem e retiram energia do embrião o processo foi repetido em todas as gotas, ocorrendo simultaneamente a contagem dos zigotos e transferi-los com pipeta de 10  $\mu$ L.

A classificação dos embriões ocorre de acordo com o estágio de evolução. Sendo classificados em; blastocisto eclodido (Be), blastocisto expandido (Bx), blastocisto (Bl) e blastocisto inicial (Bi). Este é um critério usado internacionalmente em T.E. (FERNANDES, 2001).

No CIV ocorre a divisão do zigoto para formação da blastocle, processo conhecido como clivagem. A composição do meio de CIV é baseada nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação (GONÇALVES et al.,2002).

Após o término do cultivo os embriões são classificados de acordo com seu desenvolvimento (Tabela 01).

**Tabela 01:** Classificação dos embriões bovinos quanto ao estágio de desenvolvimento e idade aproximada.

<b>Estágio de desenvolvimento</b>	<b>Idade aproximada (dias)</b>
Mórula	5 a 6
Mórula Compacta	6
Blastócito inicial	6 a 7
Blastócito	7 a 8
Blastócito expandido	8
Blastócito eclodido	9

**Fonte:** (FERNANDES, 2001)

Ao final do processo os embriões podem ser transferidos a fresco para as receptoras aptas a gerarem o feto ou podem ser vitrificados para posterior desvitrificação e transferência.

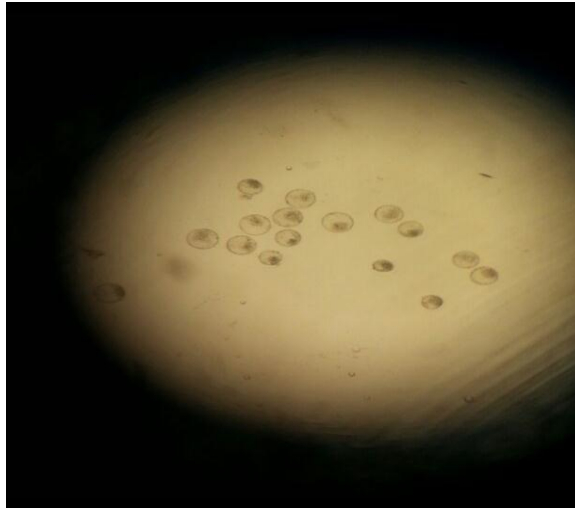


Figura 10 – Visualização de blastocistos produzidos *in vitro*.  
Fonte: Arquivo pessoal

A distância entre o laboratório e as fazendas onde os oócitos são coletados e os embriões transferidos não é mais um fator limitante a aplicação da PIVe. Atualmente, pode-se considerar que tanto a questão do transporte em longas distâncias como a criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* estão solucionadas. Com meios de cultivo apropriados e materiais que não interfiram no desenvolvimento embrionário, é possível fazer o cultivo *in vitro* de embriões bovinos em incubadoras de transporte, durante todo o período de desenvolvimento (BASSO et al., 2013). Embora a distância entre as propriedades e o laboratório não serem fator limitante de produção, o percurso contribui para o encarecimento da técnica.

Mesmo com consideráveis avanços, deve-se aprimorar a técnica para que se torne competitiva no mercado. Para melhoria nos resultados, tem sido realizados estudos avaliando as etapas envolvidas no processo de PIVe (MINGOTI, 2005).



### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A utilização de novas biotecnologias como a PIV tem contribuído para o aumento da eficiência da pecuária mundial. A PIV possibilita uma melhora na eficiência reprodutiva, um maior número de descendentes de um mesmo animal produzidos num curto espaço de tempo. Importante ferramenta para otimização de vacas com características zootécnicas superiores. Possibilita que a evolução do rebanho bovino ocorra de forma acelerada.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; FILHO, A. S. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação *in vitro* de oócitos *Bos indicus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.

BASSO et al. Novas alternativas para a aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. 4º Simpósio Interacional de Reprodução Animal Aplicada, 2013.

BRACKETT B.G.; BOUSQUET D. ; BOICE M.L. ; DONA VICK W.J. ; EVANS J.F. ; DRESSEL M.A. Normal development following *in vitro* fertilizations in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 1982 p. 147-158.

Mingoti GZ. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. *In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução*, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 171-180, 2001.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, v.1. 2002.

HAFEZ, E. S. E. e HAFEZ, B. Micromanipulação de Gametas e Embriões: Fertilização *in vitro* e transferência de embriões. *In: HAFEZ, B e HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal*, sétima edição, Manole, p. 447-469, 2004.

Sartori, R., et al. Fatores que influenciam a qualidade embrionária em bovinos. *In: 4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, setembro 2010, Londrina, PR, Anais... [s.n.]

Renesto, A.; Coelho, L. A. Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação in vitro e in vivo de embriões bovinos. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. p. 17-31., 2004.